



TroCCAP

Tropical Council for Companion Animal Parasites

Procedimientos Operativos Estándar (POE) para el diagnóstico de endo y ectoparásitos de perros y gatos en los trópicos

Primera edición, mayo de 2023

Primera edición publicada por TroCCAP ©2023 todos los derechos reservados. Esta publicación está sujeta a la condición de que cualquier distribución o reproducción de parte o la totalidad del contenido en una forma o por cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopiado, grabación o de otro modo, se realice con el permiso previo por escrito del TroCCAP



Descargo de responsabilidad

Los miembros del Tropical Council for Companion Animal Parasites Ltd. son los autores de las directrices que se presentan en esta guía.

Estas directrices de prácticas correctas se basan en la literatura científica basada en pruebas y sometida a revisión científica externa. Los autores de las directrices se han esforzado considerablemente para garantizar que la información sobre la cual se basan sea exacta y esté actualizada.

Se deben considerar las circunstancias individuales correspondientes cuando se siguen las recomendaciones incluidas en estas directrices.

Patrocinadores

El Tropical Council for Companion Animal Parasites Ltd. desea agradecer las amables donaciones de los patrocinadores que facilitaron la publicación de estas directrices que se encuentran disponibles de manera gratuita.



Contenido

Consideraciones y recomendaciones generales	2
Procedimientos operativos estándar (POE) de análisis de materia fecal.....	7
POE 1: Flotación fecal simple	8
POE 2: Flotación fecal centrífuga	12
POE 3: Técnica de Baermann	16
POE 4: Técnica de sedimentación simple	18
POE 5: Tinción acidorresistente para oocistos de <i>Cryptosporidium</i>	21
POE de análisis de sangre	23
POE 6: Prueba modificada de Knott	23
POE 7: Método del microhematocrito para la detección de microfilarias	26
POE 8: Frotis sanguíneo (incluido el extendido sanguíneo de sangre capilar de la punta de la oreja)	27
POE 9: Frotis de capa leucocítica.....	31
POE de análisis cutáneo	33
POE 10: Método de la cinta adhesiva/tira de acetato	33
POE 11: Tricograma/extracción de pelaje	34
POE 12: Raspado del pelaje en busca de ácaros y cinta adhesiva	35
POE 13: Biopsia cutánea	36
Otros procedimientos.....	37
POE 14: Examinación en busca de ácaros del oído.....	37
POE 15: Demodicosis pustular	39
POE 16: Sedimentación de orina.....	40
Referencias sobre identificación	41
Referencias de videos y métodos.....	42

Consideraciones y recomendaciones generales

Diagnóstico

- Se deben realizar pruebas de detección de parásitos gastrointestinales en los perros que habitan en los trópicos y los subtrópicos, al menos, una vez cada 3 meses para vigilar la eficacia de los planes de control de parásitos y el cumplimiento terapéutico de los propietarios.
- Se deben realizar pruebas de detección de endoparásitos en los gatos de forma regular (dos veces al año) para vigilar la eficacia de los planes de control de parásitos y el cumplimiento terapéutico de los propietarios.
- Antes de la eliminación de las formas parasitarias en las heces pueden aparecer los signos clínicos. En estos casos, la anamnesis y los signos clínicos serán los que guíen las decisiones terapéuticas.
- Para el diagnóstico de la mayoría de los parásitos internos de gatos y perros, aunque no de todos, se recomienda la técnica de flotación fecal estándar o modificada. En algunos casos, otros métodos, como la sedimentación fecal u otros métodos de diagnóstico más sensibles, pueden ser más apropiados para parásitos específicos. Estos se indican en las directrices para perros y gatos (<https://www.troccap.com/canine-guidelines> y <https://www.troccap.com/feline-guidelines>).
- En los animales con presuntas infecciones por hemoparásitos se deben realizar frotis de sangre con muestras de sangre capilar tomadas de la punta de la oreja o del borde labial exterior (ver video <https://www.youtube.com/shorts/8KCCQ1ggX9Hk>), o sangre venosa recién extraída. Para los frotis de la capa leucocítica, se puede usar sangre venosa recién extraída o sangre recolectada en un tubo con EDTA. Los frotis sanguíneos se deben realizar inmediatamente después de la extracción de la sangre a fin de conservar la morfología del parásito de manera óptima y también porque algunos microorganismos de la sangre pueden abandonar al glóbulo hospedador (p. ej., micoplasmas hemotrópicos).
- Los patógenos transmitidos por vectores se pueden detectar mediante diversos métodos de laboratorio específicos, algunos de los cuales están disponibles como pruebas comerciales para realizar en el entorno del consultorio.
- En algunos casos conviene realizar pruebas complementarias (p. ej., hemograma, análisis de orina, radiografías y ecocardiografía) para facilitar las decisiones sobre el tratamiento y el manejo del paciente. En algunos casos, el uso de métodos por imágenes también puede ser útil para confirmar el diagnóstico. Por ejemplo, la ecocardiografía puede revelar la presencia de dirofilarias en el ventrículo derecho, la endoscopia permite visualizar nódulos esofágicos causados por *Spirocerca lupi* y la tomografía computarizada puede indicar la presencia de *Onchocerca lupi* en el espacio retrobulbar.
- Las infecciones por ectoparásitos relativamente grandes (p. ej., garrapatas, pulgas y piojos), por lo general, se pueden observar macroscópicamente.
- Las infecciones por ácaros se deben diagnosticar mediante el examen microscópico de raspados de la piel (para detección de *Demodex* spp., *Sarcoptes scabiei* y *Notoedres cati*), extracciones de pelos o cinta adhesiva (para la detección de

Lynxacarus radovskyi y *Cheyletiella* spp.) o examen del oído con un otoscopio (específicamente para la detección de *Otodectes cynotis*).

- Ninguna técnica es 100 % sensible, por eso, en algunos casos, las infecciones parasitarias no pueden ser detectadas.

Técnica microscópica óptima para examinar extensiones

- Comience con el condensador cerca del escenario del microscopio. Al realizar el examen, hágalo descender para aumentar el contraste.
- Con el objetivo de 4x, use la perilla de ajuste grueso para lograr una visión clara.
- Examine metódicamente con los objetivos de 10x y 40x (20x o 60x si están disponibles) para garantizar que se examine la extensión completa. Asegúrese de que el enfoque esté ajustado todo el tiempo mientras examina la muestra para lograr una visualización detallada.
- Asegúrese de que el diafragma de iris se use para ajustar la intensidad y el contraste de la iluminación al cambiar las lentes objetivo.
- Algunas muestras (como los frotis sanguíneos) se deben examinar con una gota de aceite de inmersión para poder realizar una evaluación completa (lente objetivo 100x). Solo al examinar la muestra con bajo aumento se debe usar el objetivo 10x. Esto requiere la colocación de una gota de aceite en el cubreobjetos con la extensión y, luego, se debe mover bajo la lente 100x. Es muy importante evitar la contaminación de las otras lentes secas (40x, 60x) con aceite. Si esto ocurre, la lente objetivo-contaminada se debe limpiar suavemente con un papel para lentes y, en algunos casos, se recomienda usar una pequeña cantidad de disolvente. En primer lugar, debe verificar con el fabricante del microscopio cuál es la mejor formulación para usar.

Métodos en heces

- Los métodos de detección en heces son como una “foto instantánea de un momento específico”. Esto quiere decir que los métodos de análisis de heces representan un momento determinado en el tiempo: el momento de la recolección de la muestra. Por lo tanto, la excreción de parásitos de forma intermitente o en pocas cantidades puede no detectarse. Además, los perros y gatos pueden liberar formas inmaduras en el momento del análisis y comenzar a excretar huevos en el transcurso de los días posteriores a la obtención de un resultado negativo en heces.
- La excreción intermitente de ooquistes/quistes/huevos/larvas o su ausencia en las heces, incluso en casos sintomáticos, complica el diagnóstico.
- Si se analizan de tres a cinco muestras recogidas en días alternativos (método preferido) o consecutivos, puede aumentar la probabilidad de detectar formas parasitarias de diagnóstico en las heces.
- Un material recién extraído permite obtener mejores resultados. Si las heces no se pueden examinar en el momento de su recolección, se pueden conservar refrigeradas a 3-5 °C (no congeladas) durante varios días.
- Las heces se deben examinar macroscópicamente en busca de sangre, mucosidades, proglótidos y nematodos antes de analizarlas. La consistencia y el color (que puede ser una indicación de sangrado gastrointestinal superior o inferior) también se deben considerar al interpretar los resultados.

Métodos de flotación fecal

- La sensibilidad de los métodos de flotación se determina mediante la gravedad específica (GE) de la solución de flotación utilizada y el ooquiste/quiste/huevo que se intenta detectar. Se necesita una diferencia suficiente en las GE entre ambos para que los ooquistes/quistes/huevos floten. Consulte la tabla 1.
- Para el diagnóstico de los parásitos más internos de perros y gatos, se recomiendan las soluciones de flotación con una GE de 1.18 a 1.28. Consulte la tabla 2.
- Algunas soluciones de flotación pueden alterar la forma de los ooquistes/quistes/huevos/larvas.
- Las soluciones más viscosas se deben centrifugar.
- La selección de la solución de flotación depende del método de flotación utilizado y los parásitos que se desean detectar.
- El uso de cantidades medidas de heces y solución de flotación puede permitir la cuantificación de estadios parasitarios por gramo de heces.
- La recuperación de las formas parasitarias se puede alterar si las heces se congelan antes del análisis o se conservan en formalina (formaldehído al 2 %).

Tabla 1. Capacidad de flotación de algunos huevos de parásitos según la GE promedio

<p><u>Flotan con relativa facilidad con todas las soluciones de flotación</u></p> <p><i>Cystoisospora</i> spp. (coccidio)</p> <p><i>Ancylostoma</i> spp. y <i>Uncinaria</i> sp. (anquilostomas)</p> <p><i>Toxocara canis</i></p> <p><i>Toxocara cati</i></p> <p><i>Toxascaris leonina</i></p>
<p><u>Requieren centrifugación y una solución con una GE mayor</u></p> <p><i>Trichuris vulpis</i> (tricocéfalo)</p> <p>Algunos huevos de trematodos, p. ej., <i>Opisthorchis</i> spp., <i>Clonorchis</i> spp., <i>Haplorchis</i> spp., <i>Platynosomum</i> sp. (trematodos hepáticos y del intestino delgado de gatos). Se debe tener en cuenta que los resultados negativos falsos son comunes; <u>la sedimentación puede ser más sensible.</u></p> <p><i>Taenia</i> spp., <i>Echinococcus</i> spp., Se debe tener en cuenta que los resultados negativos falsos son comunes.</p> <p><i>Linguatula</i> spp. (pentastómido)</p>
<p><u>Presentan dificultad para flotar; se contraen en las soluciones o son demasiado pesados</u></p> <p><i>Physaloptera</i> spp. (nematodo estomacal); se contrae</p> <p><i>Spirocerca lupi</i> (nematodo esofágico); se contrae</p> <p><i>Dipylidium caninum</i> (tenia común); pesado. Se debe tener en cuenta que los resultados falsos negativos son comunes.</p> <p>Huevos de trematodos o cestodos, p. ej., <i>Diphyllbothrium</i> spp., <i>Spirometra</i> spp., <i>Paragonimus</i> spp., <i>Echinostoma</i> spp., <i>Alaria</i> spp.; son pesados y puede entrar líquido en el huevo si el opérculo se abre.</p>

Tabla 2. Soluciones de flotación comunes y su GE

Solución	GE	Formulación
Solución de azúcar de Sheather	1.27-1.3	454 g de azúcar granulada disuelta en 355 ml de agua caliente y 6 ml de formaldehído (formaldehído al 37-40 %) Nota: En cambio, se pueden usar 30 ml de formalina al 10 %; disminuya la cantidad de agua de 355 ml a 325 ml.
Sal saturada	≈ 1.2	350 a 400 g NaCl en 1 litro de agua
Sulfato de magnesio	≈ 1.2	350 a 400 g MgSO ₄ en 1 litro de agua; 700 g de MgSO ₄ si se usa heptahidrato
Sulfato de zinc	≈ 1.18-1.2 (1.25)	330 a 390 g ZnSO ₄ en 900 ml de agua
Nitrato de sodio	≈ 1.18-1.2	315 a 400 g de NaNO ₃ en 700 ml de agua

Todas las formulaciones son aproximadas. Se debe usar un densímetro para confirmar la GE. Las soluciones deben estar a temperatura ambiente para evaluar la GE.

Para ver un ejemplo de cómo preparar y medir la GE de una solución de flotación, visite: <https://youtu.be/Skx7JDUL6IE>

Técnica de Baermann

- Este método sirve para la recolección e identificación de larvas de nematodos presentes en heces.
- La cantidad de heces utilizada afecta la sensibilidad de este método: a menor cantidad de heces, menor será la sensibilidad cuando el número de larvas presentes es bajo.
- La refrigeración de las heces antes de la realización de la técnica de Baermann puede disminuir la recuperación de las larvas.
- La temperatura del agua y del ambiente con las que se realiza la técnica de Baermann puede afectar la recuperación de las larvas. Las temperaturas deben ser similares a las que las larvas encontrarían en el entorno.
- El agua que se utiliza en el instrumento de Baermann debe estar tibia (p. ej., 42 °C hasta una temperatura que sea tolerable para la piel).
- Se prefiere la estameña a la gasa, y se debe usar el número mínimo de capas para evitar que las larvas queden atrapadas.

Técnica de sedimentación

- Si bien la sedimentación se usa con mayor frecuencia para huevos grandes y pesados, como los trematodos y paquetes de huevos de *Dipylidium*, todas las formas parasitarias de diagnóstico se hundirán en agua.
- La dificultad con la sedimentación es la capacidad para ver objetos pequeños. Por lo tanto, no es el método de preferencia para muchas formas parasitarias de diagnóstico en las heces. Considere la posibilidad de usar flotación centrífuga con una solución

de GE >1.25 o el filtrado de la muestra fecal homogeneizada a través de un filtro de 0.1 mm antes de la sedimentación.

- La cantidad de heces utilizada y el sedimento examinado afecta la sensibilidad de la sedimentación.
- Este método también se utiliza para la recolección e identificación de larvas en heces.

Técnicas de detección de hemoparásitos

- Los hemoparásitos incluyen las microfilarias de los nematodos y las distintas formas de los protozoos, muchos de los cuales son transmitidos por vectores. También hay algunas importantes bacterias hemotrópicas transmitidas por vectores, como *Ehrlichia* y los micoplasmas hemotrópicos.
- En general, los métodos que usan alguna forma de concentración hemática (p. ej., prueba de Knott modificada para la detección de microfilarias, frotis de capa leucocítica para patógenos intraleucocitarios) y la tinción son más sensibles que los frotis directos.
- Además de examinar la sangre en busca de organismos, los kits comerciales y los laboratorios de referencia pueden identificar la presencia de anticuerpos, antígenos o ADN de distintos parásitos. Los resultados de los anticuerpos se deben interpretar en función del ciclo de vida, ya que pueden indicar exposición al parásito y no presencia de este. Los anticuerpos contra los patógenos pueden mantenerse hasta un año después de la cura de la infección. Consulte las directrices sobre su uso para fines de diagnóstico en perros y gatos.

Técnicas de diagnóstico de ectoparásitos

- Para la recolección de muestras (extracción de pelos, cinta adhesiva), se debe considerar el sitio donde el parásito suele ubicarse.
- En perros y gatos con pelo largo, la posibilidad de separar el pelo es importante para buscar parásitos en las puntas de las orejas y la piel.

Procedimientos operativos estándar (POE) de análisis de materia fecal

Recolección y almacenamiento de materia fecal

Un buen análisis de materia fecal comienza con el método de recolección de materia fecal. Las heces se deben recoger inmediatamente después de la defecación (del suelo o de la caja de arena), se deben almacenar a una temperatura de 3 a 5 °C antes del análisis (a menos que se vaya a realizar la prueba de Baermann) y se deben analizar en el plazo de los cinco días posteriores a la recolección. La recolección inmediata después de la defecación ayuda a garantizar que la muestra esté limpia y disminuye la probabilidad de contaminación con nematodos del suelo. La recolección rectal es posible, pero la mayor cantidad que suele obtenerse de las heces evacuadas puede aumentar el número de pruebas posibles y garantizar una cantidad adecuada para flotación, sedimentación y/o para la técnica de Baermann.

Las heces se deben colocar en un recipiente limpio, etiquetado con la identificación del animal y la fecha de recolección.

Se debe solicitar a los tutores de las mascotas que traigan heces recolectadas al consultorio tan pronto como sea posible. Después de la recolección y durante el transporte al consultorio, las heces se deben mantener en un entorno fresco. Una vez en el consultorio, la refrigeración hasta el análisis enlentecerá el desarrollo de parásitos, lo que facilitará la identificación.

Si bien muchos parásitos no son infecciosos en materia fecal recién recolectada, en regiones geográficas con *Echinococcus* spp., se deben tomar precauciones adicionales durante la recolección y el análisis.

Revoluciones por minuto (RPM) frente a fuerza g

Para muchas centrifugaciones, hay una tabla disponible para determinar la fuerza g (o fuerza centrífuga relativa) lograda según las RPM (revoluciones por minuto). No obstante, si no hay una disponible, se puede calcular de la siguiente manera:

$$\text{Fuerza } g = 1.12 \times \text{radio de rotor en mm} \times (\text{rpm}/1000)^2$$

También se puede utilizar la siguiente calculadora en línea: p. ej., http://insilico.ehu.es/mini_tools/rcf_rpm.php.

GE (gravedad específica)

La GE es el peso por volumen de unidad en comparación con el agua y se puede determinar por el peso de una solución o con un densímetro. Los densímetros se deben usar a temperatura ambiente.

Si se usa el peso, 1 litro de una solución que pesa 1.2 kg tiene una GE de 1,2.

Si se usa un densímetro, asegúrese de que el intervalo sea el apropiado para la solución. Los intervalos de un densímetro normal son >1.0 a 1.22 y 1.2 a 1.4.

Para ver un ejemplo de cómo preparar y medir la GE de una solución de flotación, visite: <https://youtu.be/Skx7JDUL6IE>

POE 1: Flotación fecal simple

La flotación fecal simple es adecuada para la recuperación e identificación de la mayoría de los huevos de nematodos, algunos huevos de tenías, quistes y ooquistes de pentastómidos (*Linguatula serrata*) y protozoos en heces caninas y felinas. El método es rápido y no es costoso; asimismo, no requiere del uso de una centrifuga. No obstante, este protocolo no incluye un paso de concentración, y no se pueden usar soluciones de flotación viscosas con una GE alta, lo que disminuye la sensibilidad cuando hay pocos huevos/quistes en las heces y para algunos parásitos con huevos con una GE levemente mayor (p. ej., *Trichuris*).

Reactivos/materiales

- Solución de flotación (p. ej., sal saturada o nitrato de sodio)
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Un frasco de boca ancha (p. ej., un frasco para recolección de orina reutilizable/lavable o un pocillo de plástico/papel)
- Tubo de ensayo desechable de 10 a 15 ml o frasco de vidrio reutilizable de boca estrecha de 10 a 15 ml
- Colador de té, gasa o estameña
- Varilla agitadora (p. ej., un bajalenguas)

Preparación de soluciones de flotación con GE de 1,20

- Nitrato de sodio:
Disuelva 315 a 400 g de nitrato de sodio en aproximadamente 700 ml de agua destilada tibia (dH₂O). Agregue más dH₂O hasta que la solución completa pese 1200 g (esto equivale a una GE de 1.20). Mezcle la solución y, luego, compruebe la GE con un densímetro.
- Sal saturada
Disuelva sal de mesa (NaCl, ~300 a 400 g) en 1000 ml de dH₂O tibia mientras agita de forma constante. Agregue sal hasta que ya no se disuelva (es decir, la sal permanece precipitada fuera de la solución una vez que se enfrió). Compruebe la GE con el densímetro.

Procedimiento

1. Con la varilla agitadora, coloque ~2 g de heces en un recipiente de boca ancha (recipiente de plástico desechable o recipiente reutilizable/lavable) (p.ej., frasco de orina/frasco de orina estéril).
2. Agregue ~4 ml de solución de flotación al recipiente y mezcle minuciosamente con las heces con la vara agitadora.
3. Agregue otros ~4 ml de solución de flotación al pocillo y vuelva a mezclar.
4. Vierta/filtre esta suspensión fecal a través de un colador de té/gasa/estameña en un nuevo recipiente.
5. Vacíe el contenido del recipiente en un tubo de ensayo de 10 a 15 ml sostenido en un bastidor o soporte o en un frasco de vidrio de boca estrecha de 10 a 15 ml.
6. Siga agregando el contenido o complete con una solución de flotación hasta que se forme un menisco positivo sobre el borde del frasco/tubo de ensayo. Los últimos

mililitros de solución de flotación se pueden verter con un gotero para asegurarse de que el menisco se forme cuidadosamente.

7. Con cuidado, coloque un cubreobjetos (aproximadamente 22 x 22 mm) sobre el tubo de ensayo.
8. Déjelo en posición vertical durante 10 a 15 minutos.
9. Con cuidado, retire el cubreobjetos del tubo, con la gota de líquido adherida a la parte inferior de este y colóquela en un portaobjetos.
10. Examine la muestra en un microscopio óptico con poco aumento (objetivo 10x; ampliación 100x) para observar las formas de los helmintos y con mucho aumento (objetivo 40x; ampliación 400x) para observar las formas de los protozoos.

Para obtener una guía alternativa paso a paso con imágenes útiles de este procedimiento, consulte: http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/Flotation/Simple_flotation/Purpose.htm

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

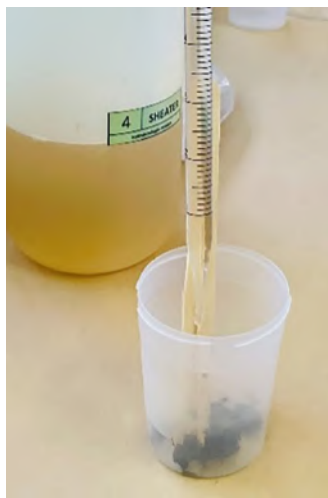
Procedimientos de limpieza

Vierta el nitrato de sodio en un recipiente de desechos químicos apropiado.

Deseche todas las extensiones, cubreobjetos y tubos de ensayo en un contenedor para objetos cortantes.

Limpie todo el equipo (colador de té, recipientes reutilizables) minuciosamente con una solución de lejía al 10 %.

Pase un paño embebido con etanol al 70 % por la superficie de trabajo.



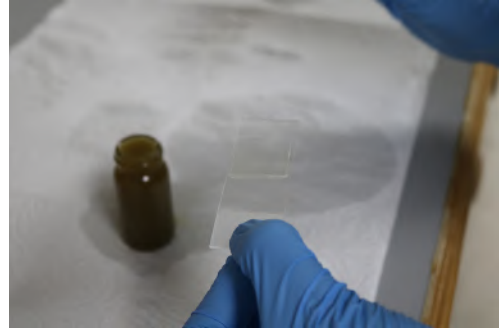
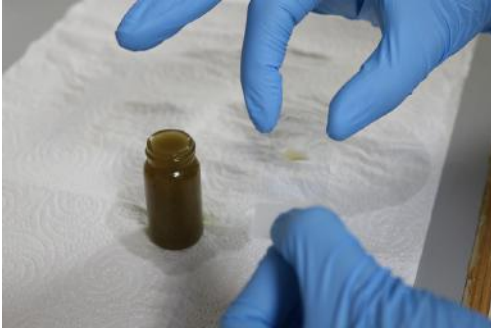
Coloque aproximadamente 2 g de heces en un recipiente de boca ancha. Agregue aproximadamente 4 ml de solución de flotación. Mezcle por completo. Agregue aproximadamente 4 ml de solución de flotación y mezcle.



Cuele la solución con una gasa, estameño o colador de té en un recipiente limpio.



Vierta la solución filtrada en un tubo de ensayo o un frasco de vidrio de boca estrecha de 10 a 15 ml. Agregue solución de flotación adicional hasta que se haya formado un menisco positivo. Coloque un cubreobjetos sobre el frasco.



Después de 10 a 15 minutos, quite el cubreobjetos y colóquelo en un portaobjetos.

POE 2: Flotación fecal centrífuga

El procedimiento de flotación centrífuga con sulfato de zinc [GE 1,18] es adecuado para el aislamiento y la identificación de quistes y ooquistes de protozoos en las heces, en particular, quistes de *Giardia duodenalis*. El procedimiento de flotación centrífuga con solución de azúcar de Sheather [GE 1,27] es más sensible para el aislamiento de huevos de nematodos más pesados, como los de *Trichuris vulpis* y *Spirocerca lupi* y el trematodo *Platynosomum*. La flotación centrífuga no es costosa; no obstante, requiere el uso de una centrífuga.

Reactivos/materiales

- Solución de flotación (p. ej., solución de sulfato de zinc o de azúcar de Sheather)
- Yoduro de lugol
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Recipiente o frasco de boca ancha (p. ej., frasco para recolección de orina reutilizable/lavable o recipiente de papel/plástico reutilizable)
- Tubo de ensayo desechable o reutilizable de 10 a 15 ml
- Colador de té, gasa o estameña
- Varilla agitadora (p. ej., un bajalenguas)
- Centrífuga para tubos de 10-15 ml; se prefiere un cubo basculante

Preparación de soluciones de flotación

- Solución de sulfato de zinc (GE 1.18)
Disuelva 331 g de sulfato de zinc en 900 ml de agua destilada tibia (dH₂O). Agregue más dH₂O hasta que la solución completa pese 1180 g (esto equivale a una GE de 1.18). Mezcle la solución y, luego, compruebe la GE con un densímetro. Nota: Si se usa heptahidrato de sulfato de zinc, se necesitará más cantidad (p. ej., aprox. 750 g)
- Solución de azúcar de Sheather (GE 1.27)
Mientras agita, agregue 454 g de azúcar a 355 ml de agua caliente. Agregue 6 ml de formalina al 10% (10 ml de formaldehído al 40% en 90 ml de agua destilada) por cada 454 g de azúcar para evitar la contaminación fúngica. Realice los ajustes necesarios con un densímetro para asegurarse de que la GE sea 1.27.

Procedimiento

1. Con la vara agitadora, coloque ~2 g de heces en un recipiente/frasco de boca ancha.
2. Agregue ~4 ml de solución de flotación al recipiente/frasco y mezcle con las heces minuciosamente con la vara agitadora.
3. Agregue otros 4 ml de solución de flotación al recipiente/frasco y vuelva a mezclar.
4. Vierta/filtre esta suspensión fecal a través de un colador de té/gasa/estameño en un nuevo recipiente/frasco.
5. Vacíe el contenido del recipiente/frasco en un tubo de ensayo de 10 a 15 ml sostenido en un bastidor o soporte.
6. Centrifugue a 500 g durante 5 minutos.
7. Con cuidado, agregue más solución de flotación hasta que se forme un menisco positivo en la parte superior del tubo de ensayo y coloque un cubreobjetos (aproximadamente 22 x 22 mm) en la parte superior.
8. Deje en posición vertical durante otros 5 a 10 minutos.

9. Con cuidado, retire el cubreobjetos del tubo con la gota de líquido adherida a la parte inferior de este y colóquela en un portaobjetos. Si agrega una solución de yoduro de lugol al portaobjetos antes de colocar el cubreobjetos, será más fácil ver los quistes de *Giardia*.
10. Examine la muestra en un microscopio óptico con poco aumento (objetivo 10x; ampliación 100x) para observar las formas de los helmintos y con mucho aumento (objetivo 40x; ampliación 400x) para observar las formas de los protozoos

Procedimiento con centrifuga basculante

1. Siga los pasos 1 a 5 descritos anteriormente.
2. Con cuidado, agregue más solución de flotación hasta que se forme un menisco positivo en la parte superior del tubo de ensayo y coloque un cubreobjetos (aproximadamente 22 x 22 mm) en la parte superior.
3. Centrifugue a 500 g durante 10 minutos.
4. Siga los pasos 9 a 10 descritos anteriormente.

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

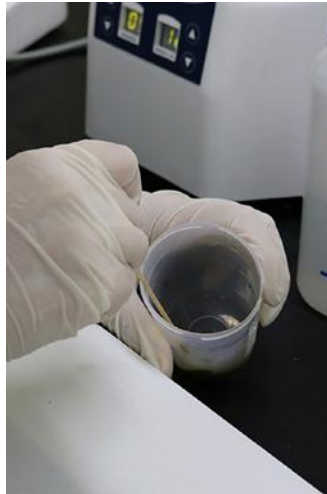
Vierta sulfato de zinc en un recipiente de desechos químicos apropiado.

Deseche todos los portaobjetos y cubreobjetos en un contenedor para objetos cortantes.

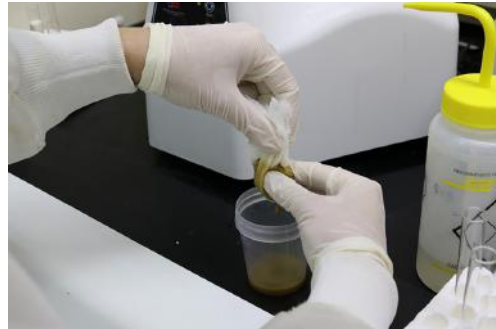
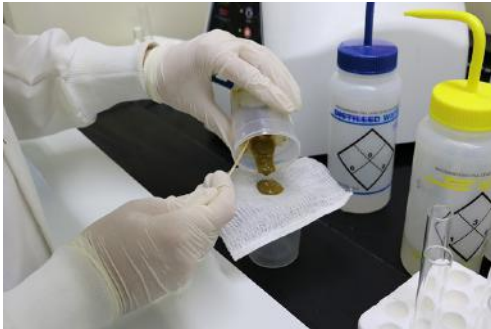
Limpie todo el equipo (colador de té, tubos de ensayo de vidrio) minuciosamente con una solución de lejía al 10 %.

Pase un paño embebido con etanol al 70 % por la superficie de trabajo.





Pese aproximadamente 2 g de heces en un recipiente de boca ancha. Mezcle las heces con solución de flotación.



Vierta la solución a través de estameño/gasa/colador de té; presione lentamente para recoger la solución. Vierta la solución en un tubo de ensayo.



Coloque el tubo en la centrífuga y hágalo girar durante 5 minutos a 500 g.

Con una centrífuga de cubo basculante, los tubos se pueden hacer girar con el portaobjetos colocado. Para todas las demás centrífugas, después de la centrifugación, llene con solución de flotación hasta que se observe un menisco positivo y, luego, coloque el cubreobjetos; permita que la muestra permanezca en reposo durante 5-10 min.

Retire el cubreobjetos y colóquelo en un portaobjetos. Examine a con una ampliación 100x.

POE 3: Técnica de Baermann

La técnica de Baermann es adecuada para el aislamiento y la identificación de larvas de nematodos (p. ej., *Strongyloides stercoralis* y parásitos pulmonares) en heces recientes.

Reactivos/materiales

- Agua destilada (dH₂O)
- Embudo de plástico o vidrio, tubo de goma y pinza O tubo de centrifuga de 50 ml
- Colador de té, gasa o estameño
- Mondadientes, banda de goma o hilo

Preparación del equipo

Fije un embudo a un soporte; conecte un tubo de goma con una pinza al tallo del embudo.

Procedimiento

1. Coloque de 3 a 5 g de heces en el centro de un gran cuadrado de estameño/gasa y átelo con una banda de goma, hilo o mondadientes para formar una bolsa.
2. Coloque la bolsa en un colador de té y suspéndala en el embudo. Si está usando un tubo de centrifuga de 50 ml, suspenda la bolsa directamente en el tubo sin un colador de té.
3. Agregue dH₂O tibia al embudo hasta que el agua cubra la parte superior de la bolsa con heces o agregue agua al tubo de 50 ml hasta que las heces queden cubiertas.
4. Deje en reposo durante 12 a 24 horas o durante la noche para recuperar larvas de los parásitos pulmonares o 6 horas para *Strongyloides stercoralis*.
5. Si está utilizando un embudo, abra el tapón del tubo de goma y recoja 2 ml del sedimento filtrado en un tubo de ensayo. Si está usando un tubo de centrifuga de 50 ml, vaya al paso 7.
6. Permita que el tubo de ensayo quede en posición vertical durante 30 minutos o centrifugue de 500 a 1000 g durante 2 minutos.
7. Retire con cuidado el sobrenadante con una pipeta y deje ~0,5 ml del sedimento intacto.
8. Tome 1 a 2 gotas del sedimento y colóquelas en un portaobjetos con un cubreobjetos. Repita según sea necesario.
9. Examine la muestra en un microscopio óptico con poco aumento (objetivo 10x; ampliación 100x) para detectar las larvas y con mucho aumento (objetivo 40x; ampliación 400x) para confirmar la presencia de un primordio genital, el tipo de esófago y la forma de la cola.

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

Deseche todos los portaobjetos y cubreobjetos en un contenedor para objetos cortantes.

Limpie todo el equipo (colador de té, embudo, tubos de ensayo de vidrio) minuciosamente con una solución de lejía al 10 %.
Pase un paño embebido con etanol al 70 % por la superficie de trabajo.

El método del aparato de Baermann (embudo con tubo y pinza).



Pese de 3 a 5 g de heces y colóquelas en estameño/gasa. Colóquelas en un colador de té y, luego, en el embudo. Llene con agua. Después de dejar reposar durante la noche, abra la pinza y recoja 2 ml del sedimento.

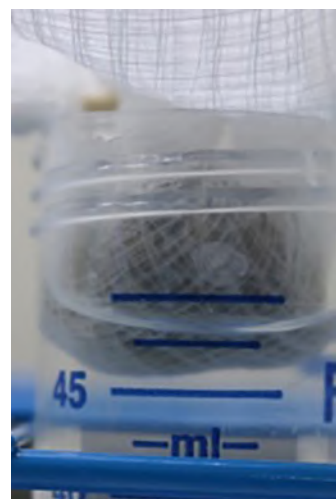
Método de tubo de centrifuga (50 ml).



Paso 1.



Paso 2.



Paso 3.

Paso 1: Coloque las heces en el centro de un trozo de gasa/estameño.

Paso 2: Suspenda en un tubo de 50 ml con agua tibia; agregue agua hasta que la materia fecal quede cubierta. Se necesita más agua.

Paso 3: Después de dejar reposar durante 6 a 24 h (según el parásito), retire el sedimento para analizarlo.

POE 4: Técnica de sedimentación simple

La técnica de sedimentación fecal es adecuada para el aislamiento y la identificación de huevos más pesados, especialmente, los de trematodos (p. ej., *Alaria* spp., *Paragonimu* spp., etc.) y algunas tenias (p. ej., *Spirometra* spp., *Diphyllobothrium latum*). El método es rápido y no es costoso; asimismo, no requiere del uso de una centrífuga.

Reactivos/materiales

- Agua destilada (dH₂O)
- Solución acuosa de azul de metileno al 5 %
- Colador de té o tamiz (aproximadamente 0.1 mm apertura)
- Recipiente/frasco de plástico
- Tubo cónico de 50 ml

Procedimiento

1. Sumerja 5 g de heces en 50 ml de dH₂O y mezcle minuciosamente.
2. Cuele con un colador de té/gasa/tamiz en un frasco de plástico para filtrar. La abertura debe ser de al menos 150 µm.
3. Vierta todo el contenido en un tubo de ensayo cónico (50 ml).
4. Permita que sedimente durante 5 minutos o, de lo contrario, centrifugue el tubo a 650 g durante 10 minutos.
5. Retire el sobrenadante.
6. Agregue agua, mezcle y permita que sedimente durante 5 minutos.
7. Retire el sobrenadante con cuidado.
8. Puede agregar 1 a 2 gotas de solución de acuosa azul de metileno al 5 % en un tubo de ensayo para ayudar con la identificación (huevos de trematodo amarillos o incoloros contra un fondo azul).
9. Transfiera 1 a 2 gotas del sedimento a un portaobjetos, coloque un cubreobjetos y examine con un microscopio óptico con poco aumento (objetivo 4x [ampliación 40x] y objetivo 10x [ampliación 100x]).

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

Deseche todos los portaobjetos y cubreobjetos en un contenedor para objetos cortantes.

Limpie todo el equipo reutilizable (colador de té, tubos de ensayo de vidrio) minuciosamente con una solución de lejía al 10 %.

Pase un paño embebido con etanol al 70 % por la superficie de trabajo.

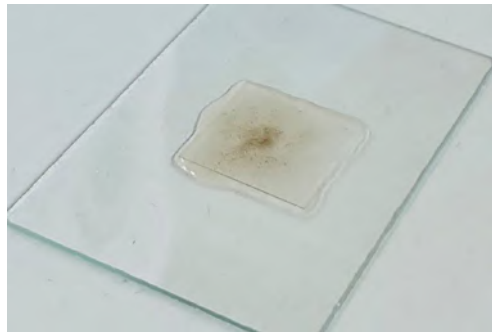
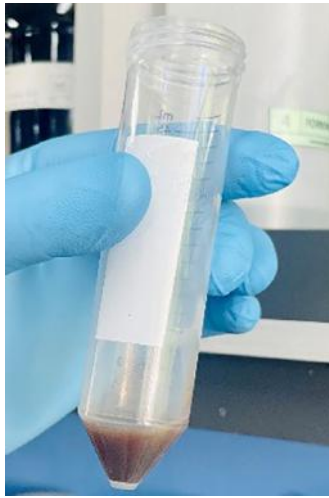


Sumerja 5 g de heces en 50 ml de dH₂O y mezcle minuciosamente.



Cuele la mezcla de heces y agua con un colador de té/gasa/tamiz en un frasco de plástico para filtrar. Vierta todo el contenido en un tubo de ensayo cónico (50 ml). Deje que sedimente durante 5 minutos.

El siguiente paso no se refleja en las imágenes: Agregue agua al tubo, mezcle, permita que sedimente durante 5 minutos y luego, quite el sobrenadante con cuidado.



Transfiera 1 a 2 gotas del sedimento a un portaobjetos, coloque un cubreobjetos y examine con un microscopio óptico con poco aumento.

POE 5: Tinción acidorresistente para ooquistes de *Cryptosporidium*

Dado que los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. son muy pequeños y difíciles de detectar para los investigadores sin experiencia; este método proporciona una tinción específica y permite una detección más sencilla.

Reactivos

- Metanol absoluto
- Carbolfucsina de Kinyoun
- Solución de ácido sulfúrico al 10% (H₂SO₄)
- Verde de malaquita al 3%

Procedimiento

1. Prepare una extensión con una capa delgada de heces y permita que se seque de forma natural.
2. Fije con metanol absoluto durante 10 minutos y permita que la extensión se seque.
3. Tiña con colorante de carbolfucsina de Kinyoun frío (filtrado) durante 5 minutos.
4. Lave cuidadosamente con agua de la canilla hasta que el agua se vea transparente (es un paso muy importante que puede llevar de 3 a 5 minutos).
5. Decolore en 10% H₂SO₄ (para extendidos muy delgados, una inmersión rápida en un frasco Coplin de ácido seguida de un enjuague inmediato con agua de la canilla es suficiente).
6. Contratiña con verde de malaquita al 3% durante 2 a 5 minutos.
7. Lave con agua de la canilla y seque con papel secante.
8. Examine con un microscopio óptico con mucho aumento (objetivo 40x; ampliación 400x) en busca de ooquistes.

Resultados

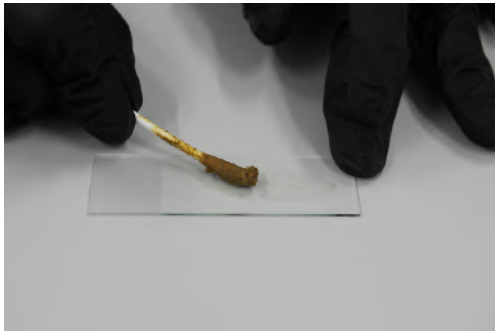
Los ooquistes se observan como cuerpos acidorresistentes (rosado brillante) de forma ovalada a redonda (4 a 6 μm de diámetro), rodeados por un halo incoloro. Las bacterias y la candidas se tiñen de color verde.

Precauciones de seguridad

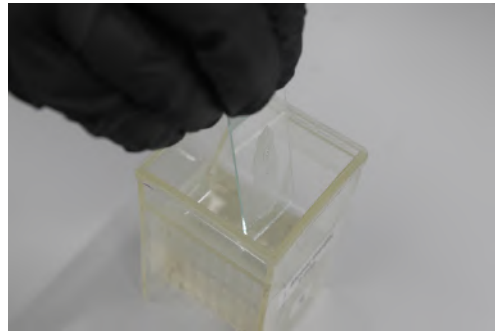
Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.
Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

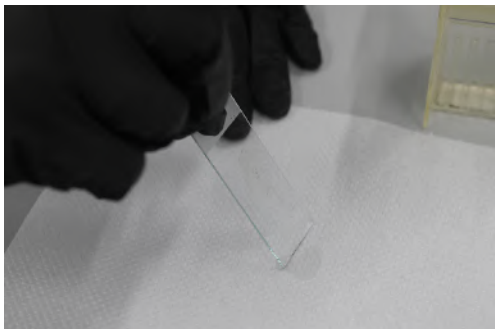
Deseche todo el equipo desechable en un cesto de desechos clínicos o un contenedor para objetos cortantes según corresponda.



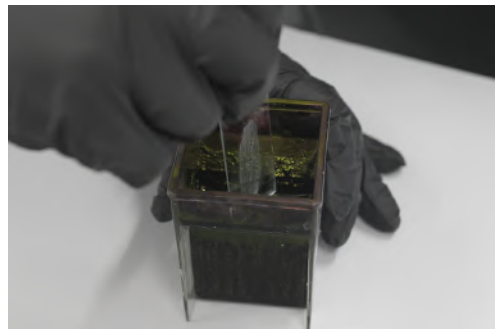
Paso 1.



Paso 2.



Paso 2.



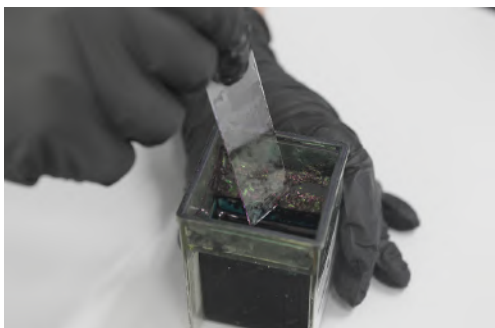
Paso 3.



Paso 4.



Paso 5.



Paso 6.



Paso 7.

POE de análisis de sangre

POE 6: Prueba modificada de Knott

Este método se usa para la detección de microfilarias en sangre. Este método es más sensible que una extensión directa con sangre recién extraída ya que concentra las microfilarias de un gran volumen de sangre. Además de las pruebas serológicas, este método también permite la detección y la identificación de microfilarias de especies distintas a *D. immitis* (p. ej. *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema* spp., y *Brugia* spp.). Las muestras de sangre deben recogerse durante la noche para lograr una mayor sensibilidad en la detección de las microfilarias de *Dirofilaria* spp.

Reactivos/materiales

- Formalina al 2 % (2 ml de formaldehído al 40 % en 98 ml de agua destilada)
- Azul de metileno al 1 %
- Tubo de centrifuga cónico
- Extensión y cubreobjetos
- Pipeta

Procedimiento

1. Mezcle 1 ml de sangre anticoagulada (en heparina o EDTA) con 9 ml de formalina al 2% en un tubo de centrifuga cónico.
2. Invierta el tubo lentamente 4 veces para mezclar la solución.
3. Centrifugue a 500 g durante 5 minutos.
4. Deseche el sobrenadante.
5. Tiña el sedimento durante 1 a 2 minutos con 1 a 2 gotas de azul de metileno al 1%.
6. Agregue una gota de la muestra en un portaobjeto de vidrio y cubra con un cubreobjeto. Repita este paso a fin de preparar 2 o más portaobjetos; de esta manera, se aumenta la sensibilidad.
7. Nota: Los pasos 1-6 se pueden repetir para aumentar la sensibilidad.
8. Examine los portaobjetos con un microscopio óptico con poco aumento (objetivo 10x; ampliación 100x) para microfilarias. Se pueden necesitar mayores ampliaciones para la identificación morfológica específica de las microfilarias.

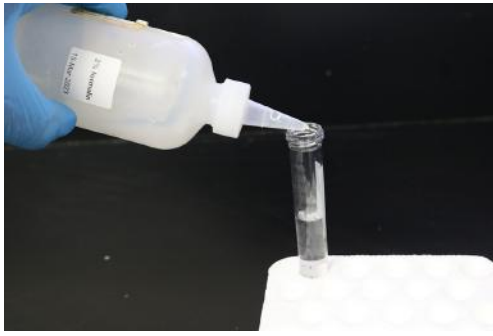
Nota: La adición de 9 ml de formalina al 2 % y los pasos de 2 a 4 se pueden repetir si se desea un sedimento más limpio.

Precauciones de seguridad

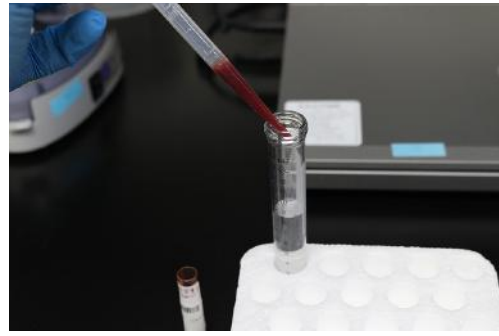
Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Procedimientos de limpieza

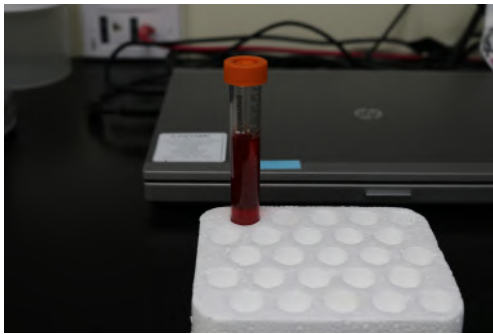
Deseche todos los portaobjetos y cubreobjetos en un contenedor para objetos cortantes.



Paso 1.



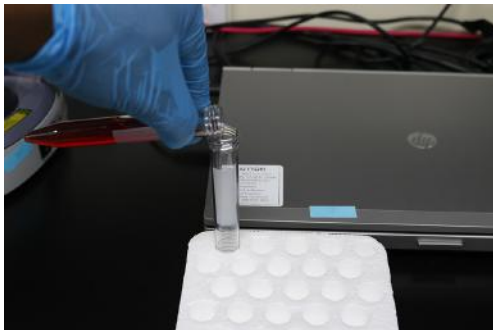
Paso 1.



Paso 2.



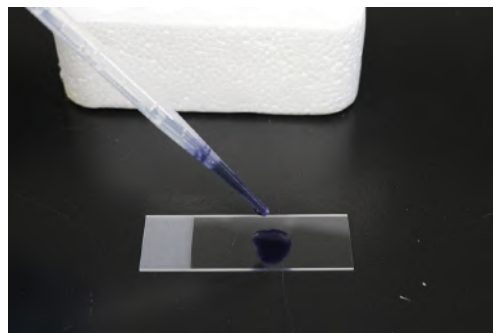
Paso 3.



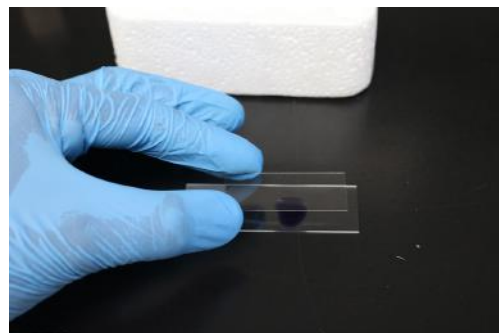
Paso 4.



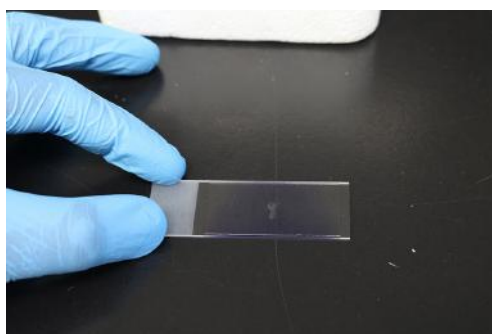
Paso 5.



Paso 6.



Paso 6.



Paso 6.

Fotografías aportadas por cortesía de Ian Branford y Shadrach Hobson-Tyson, Escuela de Veterinaria de Ross University

POE 7: Método del microhematocrito para la detección de microfilarias

El microhematocrito es un método hematológico muy usado. En las muestras de sangre positivas para microfilarias de *Dirofilaria* spp. y *Acanthocheilonema* spp., las mismas tienden a concentrarse en la fracción de la capa leucocítica del tubo del microhematocrito. Se pueden observar con el microscopio mientras están con vida y móviles.

Reactivos/materiales

- Tubos de microhematocrito

Procedimiento

1. La sangre recogida en anticoagulante (EDTA, heparina, etc.) se usa para llenar los tubos de microhematocrito (75 mm de largo, 1 mm de diámetro).
2. Centrifugue en una centrífuga de microhematocrito a 13,000 a 15,000 g durante 4 a 5 minutos.
3. El tubo de microhematocrito se retira con cuidado de la centrífuga y se coloca horizontalmente bajo un microscopio para hacer foco en la fracción de la capa leucocítica, ubicada entre el plasma y la capa eritrocitaria.
4. Examine con un microscopio óptico con un objetivo 20x (ampliación 200x) y observe las microfilarias móviles.

Resultados

Las microfilarias no se pueden diferenciar a nivel de las especies debido al movimiento y la falta de tinción para la visualización de características distintas. Las microfilarias tienden a moverse desde el área de la capa leucocítica al plasma mientras se calientan con la luz del microscopio.

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Procedimientos de limpieza

Deseche todos los portaobjetos y cubreobjetos en un contenedor para objetos cortantes.

POE 8: Frotis sanguíneo (incluido el extendido sanguíneo de sangre capilar de la punta de la oreja)

Se usan frotis sanguíneos delgados para parásitos intra y extracelulares en sangre periférica, como algunos protozoarios (*Babesia*, *Theileria*, *Rangelia*, *Cytauxzoon*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma*). Los frotis gruesos son más concentrados y sensibles que los delgados, pero se deben continuar con un extendido delgado para identificación morfológica de parásitos. Los frotis delgados y gruesos se pueden usar para detectar microfilarias, pero tienen baja sensibilidad en comparación con la prueba modificada de Knott.

En la mayoría de los casos, se deben preparar dos o más frotis para aumentar la sensibilidad del método.

Además de este POE, consulte:

Frotis sanguíneo de sangre capilar recién extraída. <https://youtu.be/EkYXXHSILYk> y <https://www.youtube.com/shorts/yfUN89hsZqs>

Frotis sanguíneo con EDTA. <https://youtube.com/shorts/j-KNiVnIAi0?feature=share>

Reactivos/materiales

- Tinción de Giemsa: Solución 1:20 (p. ej., 2 ml de solución madre de Giemsa y 40 ml de agua destilada). La solución 1:20 no debe tener más de 2 días de antigüedad.
- Frascos para tinción
- Asegúrese de que los portaobjetos estén limpios; se les debe pasar un paño con alcohol antes de manipularlos por el borde.

Procedimiento de frotis sanguíneo delgado

1. Coloque una pequeña gota de sangre recién extraída (antes de que coagule) o sangre anticoagulada con EDTA cerca de un extremo del portaobjetos.
2. Use otro portaobjetos (el esparcidor) para extender la sangre.
3. Sostenga el portaobjetos esparcidor a un ángulo de aproximadamente 45°
4. Toque el extremo distal de la sangre con el esparcidor. El extremo distal es el lado más alejado del borde del portaobjetos.
5. La sangre debe correr por el borde del esparcidor.
6. Presione con cuidado el esparcidor a lo largo de la longitud del portaobjetos.
7. Tenga en cuenta que esto lleva la sangre detrás del esparcidor. No a la parte frontal del esparcidor.
8. Presione el esparcidor para que se cierre en el extremo del portaobjetos. Esto debe tener como resultado un "borde deshilachado", un área donde se separan los glóbulos rojos.
 - a. Si no hay suficiente sangre, el frotis es corto.
 - b. Si hay demasiada sangre, el borde deshilachado no se crea.
9. Seque de forma natural.
10. Después de dejar que se seque de forma natural el frotis de sangre, fíjelo con metanol absoluto durante 5 minutos y deje que se seque de forma natural.

Procedimiento para frotis de sangre grueso

1. Coloque una pequeña gota de sangre en el centro del portaobjetos.
2. Use un palillo o el extremo de otro portaobjetos y extienda la gota de sangre con un movimiento circular.
3. El frotis resultante debe tener aproximadamente 1,5 cm de diámetro.
4. Si el portaobjetos se coloca sobre papel de diario, resultará difícil ver a través de la sangre.
5. Permita que el frotis se seque en una posición horizontal durante al menos 30 minutos. El frotis se puede dejar secar durante varias horas.
6. No fije frotis gruesos con metanol o calor.
7. Tiña con Giemsa.
8. Si la tinción se debe demorar, sumerja el frotis brevemente en agua para hemolizar los eritrocitos.

Procedimiento para frotis de sangre capilar de la oreja

1. Sostenga la oreja y corte el pelo de una pequeña área de uno de los bordes del pabellón auditivo.
2. Pase una gasa seca para retirar el pelo cortado, el polvo y las escamas. NO use ningún líquido (p. ej., desinfectante), ya que, si lo hace, impedirá que se forme la ampolla.
3. Pinche la oreja con cuidado con una aguja delgada (25 G o 26 G). (Esto se debe hacer con mucho cuidado, de modo que no salga sangre).
4. Apriete la oreja alrededor del sitio de punción para hacer que salga sangre capilar a la superficie de la piel. Debe observarse una pequeña ampolla de sangre.
5. Aplique un portaobjetos sobre la ampolla y, luego, prepare un frotis como se describe anteriormente para un frotis de sangre delgado.

Tinción y visualización (todos los tipos de frotis)

1. Si no dispone de un kit de tinción comercial, como Diff-Quik, disponible, se puede usar el siguiente método.
2. Coloque el portaobjetos en la solución de Giemsa 1:20 durante 20 a 30 minutos.
3. Lave con cuidado con agua de la canilla o sumergiendo en un frasco de agua de la canilla. No lave en exceso, si lo hace, se retirará el color.
4. Permita que se seque de forma natural en posición vertical.
5. Examine el portaobjetos con un microscopio óptico, primero con un objetivo 10x (ampliación 100x). La ampliación se puede aumentar cuando se buscan protozoos intracelulares y para la identificación de microfilarias.

Resultados

El citoplasma del parásito se teñirá de azul claro y los núcleos de magenta oscuro. Consulte las directrices de los endoparásitos caninos y felinos para ver imágenes de diversos protozoarios sanguíneos.

Si se observan microfilarias en un frotis de sangre, se debe realizar una prueba de Knott para ayudar con la identificación.

Tenga cuidado con los artefactos relacionados con el secado o la tinción.

Precauciones de seguridad

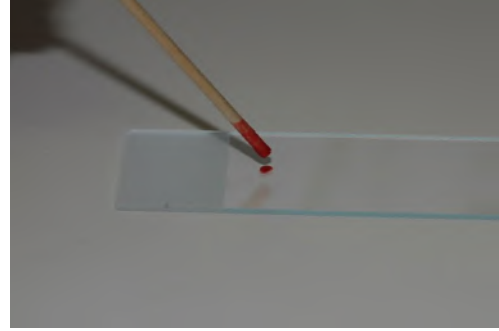
Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Procedimientos de limpieza

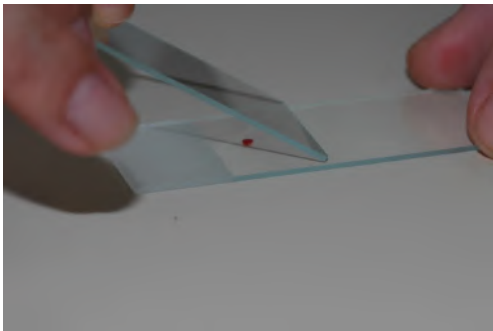
Deseche todos los portaobjetos y cubreobjetos en un contenedor para objetos cortantes.



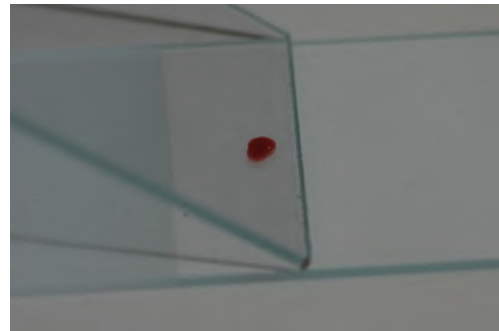
Paso 1.



Paso 1.



Paso 2.



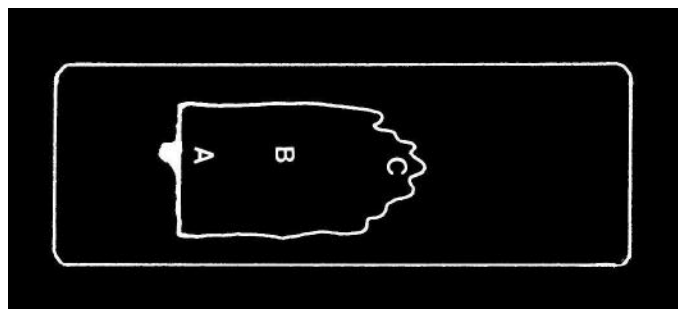
Paso 3.



Pasos 4 a 7.



Paso 8.



Paso 8. El borde deshilachado está en el área C.

POE 9: Frotis de capa leucocítica

La capa leucocítica es la fracción de la sangre que contiene la mayoría de los leucocitos y las plaquetas. Contiene leucocitos concentrados de 10 a 20 veces. Se observa después de la centrifugación de la sangre recogida con anticoagulantes. La capa leucocítica aparece como una capa delgada de color beige, que representa alrededor del 1 % del volumen total de sangre, y está ubicada en el tubo de centrifugación entre el plasma (arriba) y los eritrocitos (abajo). En parasitología, el frotis teñido con capa leucocítica representa una manera más sensible que el frotis de sangre completa estándar para detectar microscópicamente ciertos parásitos y otros patógenos que se encuentran en los leucocitos, como *Leishmania*, *Hepatozoon*, *Anaplasma* o *Ehrlichia*. La capa leucocítica también puede incluir una mayor concentración de microfilarias y/o formas de tripomastigotes del género *Trypanosoma* que la de sangre completa. La fracción de la capa leucocítica también se puede usar para extracción de ADN seguida de PCR para la detección molecular de estos parásitos.

Reactivos/materiales

- Tubo de sangre con EDTA
- Pipeta
- Tubo de hematocrito o tubo de vidrio con sangre capilar
- Tinción de Giemsa
- Portaobjetos de vidrio

Procedimiento

1. La sangre completa recogida con anticoagulante (EDTA, heparina, etc.) se centrifuga a 200 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. El tubo se retira con cuidado de la centrífuga y se coloca en un soporte para tubos.
3. Con una pipeta fina, se aspira una pequeña gota de la capa leucocítica y se la coloca en un portaobjetos.
4. Use otro portaobjetos (el esparcidor) para extender la sangre.
5. Sostenga el portaobjetos esparcidor a un ángulo de aproximadamente 45°.
6. Toque el extremo distal de la gota con el esparcidor. El extremo distal es el lado más alejado del borde del portaobjetos.
7. La gota de capa leucocítica debe correr por el borde del esparcidor.
8. Empuje con cuidado el esparcidor a lo largo del portaobjetos.
9. Tenga en cuenta que esto lleva la gota detrás del esparcidor. No a la parte frontal del esparcidor.
10. Presione el esparcidor para que se cierre en el extremo del portaobjetos. Esto debe tener como resultado un “borde deshilachado”, un área donde se separan los glóbulos rojos.
 - a. Si la gota es demasiado pequeña, el frotis es corto.
 - b. Si la gota es demasiado grande, el borde deshilachado no se crea.
11. Seque de forma natural.
12. Después de dejar que el frotis se seque de forma natural, fíjelo con metanol absoluto durante 5 minutos y deje que se seque de forma natural.
13. Coloque el portaobjetos en la solución de Giemsa 1:20 durante 20 a 30 minutos.
14. Lave con cuidado con agua de la canilla o sumergiendo en un frasco de agua de la canilla. No lave en exceso, si lo hace, se retirará el color.

15. Permita que se seque de forma natural en posición vertical.
16. Examine el portaobjetos con un microscopio óptico, primero con un objetivo 10x (ampliación 100x). La ampliación se puede aumentar al buscar protozoos intracelulares y para la identificación de microfilarias.

Resultados

Consulte las directrices caninas y felinas para ver imágenes de diversos parásitos.

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Procedimientos de limpieza

Deseche todos los portaobjetos y cubreobjetos en un contenedor para objetos cortantes.

POE de análisis cutáneo

POE 10: Método de la cinta adhesiva/tira de acetato

El método de la cinta adhesiva se puede usar alrededor de la región perianal para recoger huevos de cestodos y en diversos sitios de preferencia para recoger ácaros del pelo.

Reactivos/materiales

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Pinzas
- Cinta adhesiva transparente

Procedimiento

1. Use cinta adhesiva transparente o una tira de acetato.
2. La cinta o tira debe tener aproximadamente 2,5 cm de largo.
3. Colóquela en el pelo o la superficie cutánea.
4. Tire en la dirección del pelo.
5. Coloque el lado con adhesivo hacia abajo en un portaobjetos de vidrio.
6. Examine con un objetivo 4x o 10x (ampliación 40x o 100x) en busca de ácaros y piojos y con objetivos 10x o 40x (ampliación 100x o 400x) en busca de huevos de cestodos.

Resultados

Se podrán ver huevos de piojos y ácaros, además de una variedad de ácaros y piojos del pelo.

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.
Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

Deseche todo el equipo desechable en un cesto de desechos clínicos o un contenedor de objetos cortantes según corresponda.

POE 11: Tricograma/extracción de pelaje

Un tricograma es el examen del pelo extraído. Se usa principalmente para la detección de ácaros del pelo, pero también se puede usar para piojos. En situaciones en las que el raspado de la piel es difícil (áreas sensibles), la extracción del pelaje se puede usar para recuperar ácaros de la piel, aunque es menor la sensibilidad en comparación con los raspados de la piel. El pelaje extraído se puede colocar en un portaobjetos y examinar con un microscopio compuesto o se puede colocar en una placa de Petri y examinar con un microscopio de disección (estereomicroscopio). El pelaje obtenido al afeitar áreas para obtener raspados de la piel también se puede ver mediante el método de la extracción de pelaje.

Reactivos/materiales

- Extensión y cubreobjetos
- Pinzas
- Aceite mineral/glicerina/aceite de parafina

Procedimiento

1. Use pinzas para extraer el pelaje. Extraiga en la dirección del crecimiento del pelaje.
2. Si es posible, apriete la piel antes de extraer el pelaje y durante la extracción.
3. Se deben extraer 20 pelos como mínimo (40 pelos o más mejoran la sensibilidad).
4. Para ver con un microscopio compuesto, coloque pelo en un portaobjetos con una gota de aceite mineral/glicerina/aceite de parafina y agregue un cubreobjetos.
5. Para ver con un estereomicroscopio, coloque pelo en una placa de Petri con una gota de aceite mineral/glicerina/aceite de parafina.
6. Examine con poco aumento (objetivo 4x; ampliación 100x).

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

Deseche todo el equipo desechable en un cesto de desechos clínicos o un contenedor de objetos cortantes según corresponda.

POE 12: Raspado del piel en busca de ácaros y cinta adhesiva

Los raspados de piel profundos se pueden usar para recoger *Demodex* spp. raspando en la región de alopecia o *Sarcoptes* y *Notoedres* mediante el raspado de aproximadamente 1-2 cm de las presuntas pápulas. Los raspados de piel superficial se pueden usar para ácaros del pelaje.

Los raspados de piel se deben realizar en las áreas de preferencia y/o cerca de lesiones. Normalmente, se recogen varios raspados para analizarlos.

Si no hay un microscopio disponible en la sala de exploración o se realiza un raspado de piel durante una consulta en el domicilio, se puede usar cinta adhesiva para preservar el raspado de piel. Las muestras se deben analizar en busca de ácaros y sus huevos en el plazo de los 3 días posteriores a la extracción.

Reactivos/materiales

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Hoja de bisturí roma
- Aceite mineral/glicerina/aceite de parafina
- Cinta adhesiva transparente

Procedimiento

1. Si es necesario, afeite con cuidado el área que desea raspar.
2. Recoja los pelos para analizarlos (consulte el POE 12: Tricograma).
3. Coloque una gota de aceite mineral/glicerina/aceite de parafina en una hoja de bisturí roma.
4. Si busca *Demodex*, pellizque con cuidado la piel con el pulgar y el índice antes de raspar.
5. Raspe con cuidado la piel longitudinal y lateralmente con la hoja de bisturí roma hasta que se observe un leve sangrado capilar.
6. Coloque el material recogido en un portaobjetos para su visualización inmediata.
7. Si no se puede realizar la visualización de inmediato, coloque el material recogido en la hoja en el lado con adhesivo de un trozo de cinta adhesiva. Coloque el lado con adhesivo hacia abajo en un portaobjetos.
8. Opcional: aplique una tira de cinta (de aproximadamente 2,5 cm de largo) firmemente en la lesión que se raspó y retírela rápidamente. Coloque el lado con adhesivo hacia abajo en un portaobjetos.
9. Examine con poco aumento (objetivo 4x y ampliación 40x) y objetivo 10x y ampliación 100x).

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

Deseche todo el equipo desechable en un cesto de desechos clínicos o un contenedor de objetos cortantes según corresponda.

POE 13: Biopsia cutánea

Este método se usa para la detección e identificación de microfilarias de nemátodos del género *Onchocerca* (p. ej., *Onchocerca lupi*) y *Cercopithifilaria* (p. ej., *Cercopithifilaria baina*, *Cercopithifilaria* sp. II y *Cercopithifilaria grassi*) en la piel a través de la observación del sedimento.

Reactivos/materiales

- Punciones de biopsia (4 mm de diámetro) o bisturíes desechables
- Solución salina (NaCl al 0,9%)
- Junta de goma para asegurar la membrana
- Portaobjetos de vidrio
- Cubreobjetos (10 x 10 mm)
- Microscopio óptico
- Azul de metileno (1%)

Procedimiento

1. Recoja muestras de piel con bisturíes desechables (aproximadamente 0,5 × 0,5 × 0,6 cm) o punciones de biopsia (muestra de 4 mm de diámetro).
2. Sumerja la muestra en solución salina durante 10 min a 37 °C o durante 3 horas a temperatura ambiente (aprox. 20 °C).
3. Retire la muestra de piel.
4. Centrifugue las muestras a 650 g durante 10 minutos.
5. Coloque dos gotas de sedimento en un portaobjetos de vidrio.
6. Agregue una gota de azul de metileno (1%).
7. Observe con un microscopio óptico con poco aumento (objetivo 10x; ampliación 100x) y con mucho aumento (objetivo 40x; ampliación 400x) para confirmar la especie.
8. Identifique las microfilarias de acuerdo con su morfología.

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Procedimientos de limpieza

Deseche todos los portaobjetos y cubreobjetos en un contenedor para objetos cortantes.

Otros procedimientos

POE 14: Examinación en busca de ácaros del oído

Los ácaros del oído (*Otodectes*) se pueden ver macroscópicamente y microscópicamente. A menudo, los ácaros del oído se pueden ver al realizar un examen con un otoscopio, aunque este método no es tan sensible como un examen de residuos óticos recogidos con un hisopo. Los perros y gatos con infecciones con ácaros del oído pueden tener infecciones bacterianas secundarias. Estas infecciones pueden ser dolorosas y requerir que se coloque un bozal a un perro antes del examen o que se administre un analgésico.

Reactivos/materiales

- Otoscopio
- Hisopo
- Aceite mineral/aceite de parafina
- Extensión y cubreobjetos

Procedimiento (otoscopio)

1. Levante el pabellón auditivo.
2. Coloque con cuidado el espéculo en la abertura del canal auditivo.
3. Mientras mira a través del otoscopio, mueva lentamente el espéculo por el canal auditivo vertical.
4. Observe si hay movimiento en la cera y los residuos óticos. Los *Otodectes* pueden aparecer como puntos blancos en la cera oscura.
5. Si el oído está especialmente lleno de residuos óticos, puede ser mejor usar un espéculo más ancho.
6. Los residuos óticos y la cera pueden llenar la punta del espéculo. Los residuos óticos y la cera se pueden examinar como se describe a continuación con un hisopo.

Procedimiento (hisopo)

1. Con la ayuda de un hisopo con punta de algodón recubierto ligeramente con aceite mineral/aceite de parafina, quite los residuos óticos cerosos oscuros de ambos oídos.
2. Observe el hisopo para comprobar si hay movimiento. Si lo hay, lo más probable es que se deba a la presencia de ácaros del oído.
3. Coloque 2 a 3 gotas de aceite mineral/aceite de parafina en un portaobjetos de vidrio.
4. Mezcle los residuos óticos recogidos del oído en el hisopo con el aceite.
5. Retire las partículas grandes de residuos óticos.
6. Coloque un cubreobjetos sobre el portaobjetos.
7. Examine con poco aumento (objetivo 4x y 10x, ampliación 40x y 100x).

Resultados

Con ambos procedimientos los ácaros se pueden detectar por su movimiento. La observación con el microscopio confirma la identificación y aumenta la sensibilidad del método.

Precauciones de seguridad

Use una bata de laboratorio y guantes desechables. Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

Deseche todo el equipo desechable en un cesto de desechos clínicos.

POE 15: Demodicosis pustular

El raspado del pelaje a menudo es negativo cuando un perro tiene demodicosis pustular. Este método puede aumentar la recuperación y confirmación de una infección en estas circunstancias.

Reactivos/materiales

- Extensión y cubreobjetos

Procedimiento

1. Apriete una o dos pústulas.
2. Recoja el material presionando un portaobjetos firmemente contra la piel.
3. Coloque un cubreobjetos sobre el portaobjetos.
4. Examine la preparación con poco aumento (objetivo 10x, ampliación 100x) y con mucho aumento (objetivo 40x, ampliación 400x).

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

Deseche todo el equipo desechable en un cesto de desechos clínicos o un contenedor para objetos cortantes según corresponda.

POE 16: Sedimentación de orina

La sedimentación de orina se puede usar para identificar huevos de *Dioctophyme renale* y *Pearsonema plica* (sinónimo de *Capillaria plica*).

Reactivos/materiales

- Extensión y cubreobjetos
- Tubo de centrifuga de 10-15 ml
- Yoduro de lugol
- Ácido acético

Procedimiento

1. Recoja una muestra de orina en un recipiente de plástico desechable.
2. Llene un tubo de 10 o 15 ml con la muestra y centrifugue a 3000 rpm durante 10 minutos. Retire el sobrenadante.
3. Tome 1-2 gotas del sedimento en un portaobjetos de vidrio y agregue un cubreobjetos.
4. La muestra se puede mezclar con una gota de yoduro de lugol para agregar contraste.
5. Si la muestra se cubre con eritrocitos, se puede mezclar con 2 a 3 gotas de ácido acético.
6. Examine la preparación con poco aumento (objetivo 10x, ampliación 100x) y con mucho aumento (objetivo 40x, ampliación 400x).

Precauciones de seguridad

Utilice una bata de laboratorio y guantes desechables.

Lávese las manos minuciosamente una vez que haya terminado el procedimiento.

Procedimientos de limpieza

Deseche todo el equipo desechable en un cesto de desechos clínicos o un contenedor para objetos cortantes según corresponda.

Referencias sobre identificación

Huevos y ooquistes en las heces

- [1] Zajac AM, Conboy GA, Little SE, Reichard MV. 2021. Veterinary Clinical Parasitology 9th edition. Wiley-Blackwell. Disponible de forma electrónica.
- [2] Eggs found in Faecal Floats
<https://shire.science.uq.edu.au/parasites/helminths/nematodes/faecal-floats.php>
- [3] www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html

Larvas en las heces

- [1] Di Cesare A, Traversa D. 2014. Canine angiostrongylosis: recent advances in diagnosis, prevention, and treatment. Vet Med (Auckl). 5:181-192. doi:10.2147/VMRR.S53641
- [2] Greve JH. 1985. Identifying nematode larvae in feces of dogs and cats. Iowa State University Veterinarian. 47(2): 98-101.
http://lib.dr.iastate.edu/iowastate_veterinarian/vol47/iss2/4
- [3] McGarry JW, Morgan ER. 2009. Identification of first-stage larvae of Metastrongyles from dogs. Vet Rec 165(9):258-261.
- [4] Traversa D, Di Cesare A, Conboy G. 2010. Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. Parasit Vectors. 3:62.
doi:10.1186/1756-3305-3-62

Microfilaria en la sangre

- [1] Companion Animal Parasite Council Guidelines. <https://capcvet.org/guidelines/heartworm/>
- [2] Magnis J, Lorentz S, Guardone L, et al. 2013. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. Parasit Vectors. 6:48. doi:10.1186/1756-3305-6-48
- [3] Parasitological Diagnosis in Cats, Dogs and Equines. ESCCAP Guideline 04 First Edition – November 2022.
www.esccap.org/uploads/docs/hgqo8xak_1335_ESCCAP_GL4_v2_1p.pdf page 35

Microfilaria en la piel

- [1] Mutafchiev Y, Dantas-Torres F, Giannelli A, Abramo., Papadopoulos E, Cardoso L, Cortes H, Otranto D. 2013. Redescription of *Onchocerca lupi* (Spirurida: Onchocercidae) with histopathological observations. Parasit Vectors 6:309.
- [2] Otranto D, Varcasia A, Solinas C, Scala A, Brianti E, Dantas-Torres F, Annoscia G, Martin C, Mutafchiev Y, Bain O. 2013. Redescription of *Cercopithifilaria binae* Almeida & Vicente, 1984 (Spirurida, Onchocercidae) from a dog in Sardinia, Italy. Parasit Vectors. 6:132.
doi:10.1186/1756-3305-6-132.
- [3] Otranto D, Brianti E, Dantas-Torres F, Miró G, Latrofa MS, Mutafchiev Y, Bain O. 2013. Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. Parasitology 140(1):99-108. doi:10.1017/S0031182012001357.

Identificación de garrapatas

- [1] Barker SC, Walker AR. 2014. Ticks of Australia: The Species That Infest Domestic Animals and Humans. Magnolia Press, Auckland. <http://www.alanwalker.com/guidebooks/ticks/>

- [2] Bristol University Tick ID. Key to Genera.
<http://www.bristoluniversitytickid.uk/page/Key+to+Genera/6/#.Y7NaNHbMI2w>
- [3] Madder M, Horak I, Stoltz H. Ticks of veterinary importance and Tick Identification. https://www.afrivip.org/sites/default/files/Ticks_identification/ticks_importance/ and https://www.afrivip.org/sites/default/files/Ticks_identification/index/ (Africa). Consultar también www.afrivip.org/sites/default/files/07_identification_vetimportance.pdf
- [4] Szabó MP, Pinter A, Labruna MB. 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:27. doi:10.3389/fcimb.2013.00027
- [5] TickEncounter Identification Guide. <https://web.uri.edu/tickencounter/fieldguide/id-guide/>
- [6] Walker AR, Bouattour A, Camicas J-L, et al. 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. University of Edinburgh.
<http://www.alanwalker.com/guidebooks/ticks/>
- [7] Zajac AM, Conboy GA, Little SE, Reichard MV. 2021. *Veterinary Clinical Parasitology* 9th edition. Wiley-Blackwell. Disponible de forma electrónica.

Identificación de ácaros, piojos y pulgas

- [1] Common parasites of veterinary importance, Mite identification key.
<https://shire.science.uq.edu.au/parasites/arachnids/mites/mites-identification.php>
- [2] Dantas-Torres F, Otranto D. 2014. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box [la corrección publicada aparece en *Parasit Vectors.* 2016;9(1):298]. *Parasit Vectors.* 7:22. doi:10.1186/1756-3305-7-22
- [3] Flea Identification. www.cdc.gov/nceh/ehs/docs/pictorial_keys/fleas.pdf
- [4] Common parasites of veterinary importance. Key to Flea Species of Veterinary Importance in Australia. <https://shire.science.uq.edu.au/parasites/insects/fleas/fleas-key.php>

Referencias de videos y métodos

- [1] Parasitological Diagnosis in Cats, Dogs and Equines. ESCCAP Guideline 04 First Edition – November 2022. Gratuito y disponible de forma electrónica.
www.esccap.org/uploads/docs/hgqo8xak_1335_ESCCAP_GL4_v2_1p.pdf
- [2] The RVC/FAO Guide to Veterinary Diagnostic Parasitology.
<https://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/Faeces/Purpose.htm>
- [3] Zajac AM, Conboy GA, Little SE, Reichard MV. 2021. *Veterinary Clinical Parasitology* 9th edition. Wiley-Blackwell. Disponible de forma electrónica.
- [4] Preparación y medición de la GE de una solución de flotación.
<https://youtu.be/Skx7JDUL6IE>
- [5] Frotis sanguíneo de sangre capilar recién extraída. <https://youtu.be/EkYXXHSILYk> y <https://www.youtube.com/shorts/yfUN89hsZqs>
- [6] Frotis sanguíneo con EDTA. <https://youtube.com/shorts/j-KNiVnIAi0?feature=share>
- [7] Recolección de sangre de la punta de la oreja.
<https://www.youtube.com/shorts/8KCCQ1ggX9Hk>